

分子生物学方法在肠球菌耐药性研究中的应用*

王 珊, 吕 媛 (北京大学第一医院临床药理研究所, 北京 100191)

摘要:目的 为了及时准确地检测细菌的耐药性, 该文将肠球菌耐药性研究中的分子生物学方法进行综述。方法 对近年来肠球菌耐药性研究的相关文献进行整理、分析与归纳。结果 一些方法比较常见, 如 PCR, PFGE, MLST 和 Southern 杂交等, 而一些方法如焦磷酸测序和基因芯片技术, 目前在细菌耐药机制研究中的应用并不广泛, 属于交叉学科, 但是稍加利用会有一定的发展前景。结论 任何一个方法都有优点, 也存在一些局限性, 应取长补短, 发挥每种方法的最大优势。

关键词: 肠球菌; 耐药性; 分子生物学; 万古霉素耐药肠球菌

中图分类号: R378.1; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)01-004-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.002

Application of Molecular Biology in Investigation of Resistance in *Enterococci*

WANG Shan, LU Yuan (Institute

of Clinical Pharmacology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: **Objective** This article aims to provide mechanisms and recent developments of molecular biology pertaining to resistance of *Enterococci*, providing rapid approaches for detecting resistant strains. **Methods** This article reviewed recent literatures on resistance of *Enterococci* and a systemic analysis was conducted. **Results** Common detecting methods include polymerase chain reaction (PCR), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and Southern blot. There also exist less widely-used methods such as pyrosequencing and genechip technique, which may prove efficient in some aspects. **Conclusion** Every method has its advantages and disadvantages. This article discussed how to utilize these methods to achieve their maximum capabilities.

Keywords: *enterococci*; resistance; molecular biology; vancomycin-resistant enterococci

肠球菌是仅次于葡萄球菌的医院感染革兰阳性菌, 可造成泌尿系统感染、伤口感染、腹膜炎、心内膜炎、败血症等。尤其是随着万古霉素耐药肠球菌 (vancomycin-resistant *enterococci*, VRE) 的增加, 给临床治疗带来很大困难^[1,2]。目前, 肠球菌耐药性的研究已经到达分子水平, 分子生物学方法已成为有效研究肠球菌耐药性的一个有用的工具。本文将针对肠球菌的耐药性研究, 介绍一些分子生物学方法的研究进展。

1 飞行时间质谱和聚合酶链反应

1.1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 和聚合酶链反应 (PCR) 鉴定肠球菌属及基因分型 1985 年 Kary 创建了聚合酶链式反应, 是一种在体外模拟自然 DNA 复制的核酸扩增技术^[3]。实验室常用的鉴定肠球菌属的方法主要是使用生化试验鉴定表型, 如 API 法和 VITEK 革兰阳性菌鉴定系统。尽管试剂盒的成本合理, 结果可以在 24 h 之内获得, 但是对它的可靠性存在担忧。可能的原因是非典型的种属不能与目前生化试验设计相一致, 或者试剂盒对新种属

没有建立新的常规鉴定方法。为了克服生化试验相关的问题, 发展了分子生物学方法。目前, 运用新的 MALDI-TOF-MS, 可以快速、准确、低成本地鉴定肠球菌属^[4]。快速诊断是治疗和预防 VRE 感染的关键, 为了建立肠球菌 van 基因分型及鉴别的方法, Gurtler 等^[5]人开发了两个可用于高分辨率溶解曲线-PCR (HRM-PCR) 技术的多重 PCR 反应: 用 vanA, vanB, vanC, vanC23 基因的引物来检测不同肠球菌种中的 van 基因; 用 ISR (16S 和 23S rRNA 基因间隔区引物) 来检测所有肠球菌属, 并获得属特异和种特异的 HRM 曲线。

1.2 实时定量 PCR 法检测 VRE 中 vanA, vanB 基因 实时定量 PCR (real time PCR) 是一种新的核酸定量技术, 是在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针来实现其定量功能的。与普通的 PCR 相比, 实时定量 PCR 具有快速、高特异度和高灵敏度等优点。实时定量多重 PCR 可以用于快速检测临床直接分离的 VRE 样本中 vanA, vanB 基因^[6,7]。试验中, 杂交探针是用探针设计软件 Roche Applied Science LightCycler 设计的, 并通过 Gen-

* 作者简介: 王 珊 (1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 从事细菌耐药机制研究, Tel: 13691189003, E-mail: tigerwangshan@126.com。
通讯作者: 吕 媛, 女, 研究员, 博士生导师, 从事临床药理学研究, E-mail: lyzx5857@163.com。

Bank 中的 BLAST 进行搜索比对,确保寡聚核苷酸引物和杂交探针的特异度。经对比,实时定量 PCR 用时 1.5 h,而普通 PCR 则需要 5.5 h。PCR 法虽然快速,但是也存在一些缺点,它的灵敏度高,但是准确性不如 southern 杂交,易产生假阳性^[3]。

2 Southern 杂交技术在 VRE 研究中的应用

Southern 杂交技术的原理首先由 Edwen Southern 在 1975 年提出。Southern 杂交技术的具体步骤看上去很复杂,但是无论是 VRE 研究还是其它领域内的研究,只要依据《分子克隆》和文献[8,9]中的步骤,再根据自己的试验稍作改进,便可进行。通过 Southern 杂交技术可以定位 vanA 基因^[1]。一般情况下 vanA 基因位于肠球菌的质粒上^[3],可以通过提取质粒 DNA 后,用限制性内切酶 EcoRI 消化质粒 DNA,再设计 vanA 基因的探针,进行 Southern 杂交检测。Southern 杂交技术还可以构建肠球菌质粒的限制性内切酶图谱^[10],这需要为每一个耐药基因设计不同的特异性引物,通过琼脂糖凝胶电泳纯化,作为 Southern 杂交的探针,来定位耐药基因在限制性内切酶图谱中的大概位置。

3 脉冲场凝胶电泳在 VRE 分子流行病学分析中的应用 1984 年 Schwartz 等报道了脉冲电场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis, PFGE)的设计思想,它是用于分离大分子量线状 DNA 的一种电泳方法^[9]。

肠球菌 PFGE 的周期一般需要 5~7 天,方法分为四步^[1,9,11~13]:①细菌基因组 DNA 的制备:包括增菌、收集菌体、低熔点琼脂糖制作细菌包埋胶块、溶菌酶溶解细菌细胞壁、蛋白酶 K 消化、多次加洗液等步骤,大约需要 3 天时间,制作出的细菌包埋胶块可以在 4℃ 保存 1 个月。②限制性内切酶酶切:肠球菌一般选用 SmaI,25℃ 水浴中过夜酶切。③脉冲场凝胶电泳:实验室选择仪器的厂家、型号不同,电泳的条件也不尽相同,需要进行预摸试验。如 Zheng 等人^[1],使用伯乐公司(Bio-Rad) CHEF Mapper system 的 PFGE 仪器,电泳条件为 1 g/dl 琼脂糖,0.5%×TBE buffer,时间 1 s~23 s,电压 6V/cm,电泳 22 h。电泳这一步看似简单,但是往往是试验成败的关键,因为电泳的过程中,DNA 存在着降解的问题,使条带变得模糊或者没有条带。为了解决这一问题,可以在配制电泳液时,加入硫尿(终浓度 100 μmol/L)^[13]。④溴化乙锭(EB)染色和成像。由于其操作周期较其它方法长,所以每一步都非常关键。

在临床工作中,用于流行病学调查研究,为了节省时间,快速判断是否是 VRE 的大规模暴发,可以采用改进的快速分型法来进行 VRE 的 PF-

GE^[12],包括以下步骤:① 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),50 mmol/L EDTA,1 250 U/ml 变溶菌素(mutanolysin),2.5 mg/ml 溶菌酶(lysozyme),1.5 mg/ml 蛋白酶 K,37℃,10 min;② 0.5 mol/L EDTA,1 g/dl 十二烷基肌氨酸钠(sarcosyl),400 μg/ml 蛋白酶 K,55℃ 2 h,水洗,50℃ 10 min,共 3 次,TE 洗,50℃ 10 min,共 3 次;③ SmaI (30 U) 25℃ 酶切 2 h;④ 电泳 20 h,25 min EB 染色和成像;共需时间大约 28 h。值得注意的是,快速法虽然省时简单,但是更加要求操作者技术的准确和熟练,使用的试剂成本也相应增加。

4 多位点基因序列分析(MLST) 多位点基因序列分析法(multilocus asequence typing)是近年报道的一个具有很高分辨能力的分子生物学方法,通过序列的变化反映菌株之间的进化关系,可用于分子进化学的研究。

肠球菌中 MLST 研究最多的为屎肠球菌和粪肠球菌,其优势是具体的方法可以登录大型数据库的国际网站(www.mlst.net)查询,并且可直接将本地的实验结果提交数据库进行比较,分析 VRE 临床分离株的遗传相关性。屎肠球菌和粪肠球菌各以 7 个管家基因(housekeeping gene)的 PCR 片段序列分析为基础,比较等位基因谱。屎肠球菌的 MLST 可以参照 Homan 等^[14]人的文献,设计合成 7 个管家基因的引物,粪肠球菌的 MLST 条件可以直接参照 MLST 网站上的说明。7 个管家基因分别为:gdh,gyd,pstS,gki,aroE,xpt 和 yiqL。肠球菌 MLST 方法的建立为肠球菌分型和不同实验室数据比较提供一个参考方法。这样,MLST 数据库能够成为全球流行病学研究的有力资源,识别和跟踪世界范围内医院间有毒力的、流行的以及多重耐药的肠球菌克隆株传播。

5 焦磷酸测序法在肠球菌耐药机制研究中的应用

在细菌耐药机制研究实际工作中,很多情况需要对已知序列的 DNA 片段进行序列验证,而这种分析往往测几十 bp 就可以满足需要,Sanger 双脱氧核苷酸链终止法和 Maxam-Gilbert 化学法^[3,8,9]未必是最合适的。焦磷酸测序技术(pyrosequencing)是由 Nyren 等^[15,16]于 1987 年发展起来的一种新型的酶联级联测序技术,焦磷酸测序法适于对已知的短序列的测序分析,其可重复性和精确性能与 SangerDNA 测序法相媲美。而且它具有快速、准确、经济、实时检测的特点,不需要凝胶电泳,也不需要 DNA 样品进行任何特殊形式的标记和染色,有高度的并行性和高度的自动化。目前在细菌耐药机制研究中的应用并不广泛,但是在今后会有一定的发展空间。

焦磷酸测序的原理是:引物与模板 DNA 退火后,在 DNA 聚合酶(polymerase)、ATP 硫酸化酶(ATP: sulfurylase, 或 ATP: sulfate adenylyl transferase)、荧光素酶(luciferase)和三磷酸腺苷双磷酸酶(apyrase)4 种酶的协同作用下,每一个 dNTP 的聚合与一次荧光信号的释放偶联起来,以荧光信号的形式实时记录模板 DNA 的核苷酸序列^[17]。

肠球菌,特别是屎肠球菌,常常多重耐药,对它们造成严重感染的治疗可能存在问题。利奈唑胺是新型唑烷酮类抗生素,通过与细菌 23S rRNA 结合抑制细菌蛋白合成而产生抗菌作用,对包括万古霉素耐药的葡萄球菌、肠球菌均有很强的抗菌活性。利奈唑胺耐药肠球菌(LRE)比较罕见,但是会在用利奈唑胺治疗的过程中出现,这种耐药性与染色体突变相关,影响 23S rRNA 肽基转移酶区域。临床分离 LRE 菌株中,利奈唑胺耐药被多重等位基因编码的 23S rRNA 中的 G2576T 单核苷酸多态性(SNP)介导。焦磷酸测序法用于快速检测 SNPs,来检测和评估包含 T2576 突变的 23S rRNA 的数目^[18]。Alistair Sinclair 等用这一方法检测菌株纯合子的 G2576 或 T2576 或者杂合子在这个位置的突变,表明与 PCR 限制性(内切酶)片段长度多态性具有 100%的一致性,而且省时快速。

6 基因芯片技术

6.1 基因芯片技术的基本概念和原理 基因芯片技术是随着“人类基因组计划”的进展在 20 世纪 80 年代出现,并于 90 年代中期兴起的一种超高通量检测基因表达的新技术。基因芯片(gene chip)又称 DNA 芯片(DNA chip)、DNA 微阵列(DNA microarray),是生物芯片(Biochip)的一种,即将无数预先设计好的寡核苷酸, cDNA 基因组 DNA 在芯片上做成点阵,与样品中同源核酸分子杂交。包括两种模式:一是将靶 DNA 固定于支持物上,适合于大量不同靶 DNA 的分析;二是将大量探针分子固定于支持物上,适合于对同一靶 DNA 进行不同探针序列的分析。将待测样本标记后同芯片进行杂交,检测原理是利用核酸配对原理,样本中的标记分子与芯片上的配对探针分子特异性结合,通过激光共聚焦荧光扫描仪或其它检测手段获取信息,经电脑系统处理、分析得到信号值,信号值代表了结合在探针上的待测样本中特定大分子的信息,从而检测对应片段是否存在、存在量多少^[8]。

6.2 基因芯片技术检测肠球菌耐药性 基因芯片技术对于耐药基因的检测可从两个方面实现:一是通过基因表达谱芯片检测药物诱导基因表达的改

变来分析其耐药性;二是寡核苷酸芯片检测基因组序列的亚型或突变位点来分析耐药性。目前,该技术已经在抗生素耐药性的机制和流行病学研究中得到应用^[19]。国外有文献报道^[20],利用肠球菌糖肽类耐药的机制,把不连续的遗传成分如携带突变、缺失和部分分裂作为参照标准,以一个自定义的寡聚核苷酸 DNA 微点阵作为工具,对肠球菌糖肽类耐药基因族生产靶向作用,从而可以大规模检测糖肽类耐药肠球菌,检测效率比传统检测手段有了极大的提高。在检测肠球菌耐药性方面,目前国内文献报道的相对较少。如果实验室有一定的经济条件,那么掌握好原理,建立一个基因芯片检测肠球菌耐药性的新方法将是有突破意义的。

结语 本文综述的这些分子生物学方法虽然是对肠球菌耐药性的,但是对其它细菌的耐药性研究也提供了一个科研的思路,有一定的帮助。一些方法比较容易掌握,如 PCR, PFGE 和 MSLT;有一些方法如焦磷酸测序法和基因芯片技术,目前在细菌耐药机制研究中的应用并不广泛,属于交叉学科,但是稍加利用会有一定的发展前景。任何一个方法都会存在一些局限性,而且每种方法都可以展开来的更加具体独立成篇,如何取长补短,发挥每种方法的最大优势,或者几种方法结合起来,从不同角度一起验证一个问题是值得继续探索的。

参考文献:

- [1] Zheng B, Tomita H, Xiao YH, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococcus faecium isolates from mainland China[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2813-2818.
- [2] Yahdi M, Abdelmageed S, Lowden J, et al. Vancomycin-resistant enterococci colonization-infection model: parameter impacts and outbreak risks[J]. J Biol Dyn, 2012, 6(2): 645-662.
- [3] 严杰, 钱利生, 余传霖. 临床医学分子细菌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 75-100, 217-233. Yan J, Qian LS, Yu CL. Clinical Molecular Bacteriology[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2005: 75-100, 217-233.
- [4] Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, et al. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK2 system for the identification of clinical Enterococcus isolates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(11): 3073-3077.
- [5] Gurtler V, Grando D, Mayall BC, et al. A novel method for simultaneous Enterococcus species identification/typing and van genotyping by high resolution melts analysis[J]. J Microbiol Methods, 2012, 90(3): 167-181.

- [6] Cantarelli V, Cavalcante B, Pilger DA, et al. Rapid detection of Van genes in rectal swabs by real time PCR in Southern Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2011, 44(5):631-632.
- [7] Fang H, Ohlsson AK, Jiang GX, et al. Screening for vancomycin-resistant *Enterococci*: an efficient and economical laboratory-developed test[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(3):261-265.
- [8] 冯作化. 医学分子生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001:162-213.
- Feng ZH. Medical Molecular Biology[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2001:162-213.
- [9] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 429-455, 487-509, 981-1073.
- Sambrook J, Russell DM. Molecular Cloning A Laboratory Manual[M]. 3th Ed. Huang BT, Translated. Beijing: Science Press, 2002: 429-455, 487-509, 981-1073.
- [10] Lim SK, Tanimoto K, Tomita H, et al. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10):6544-6553.
- [11] Liu Y, Cao B, Gu L, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococci* in a Chinese hospital between 2003 and 2009[J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(3):449-455.
- [12] Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, et al. Improved pulsed-field gel Electrophoresis for typing vancomycin-resistant *Enterococci*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11):4242-4245.
- [13] Zhang YS, Yakus MA, Graviss EA, et al. Pulsed-field gel Electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5582-5587.
- [14] Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6):1963-1971.
- [15] Nyren P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity[J]. Anal Biochem, 1987, 167(2):235-238.
- [16] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate[J]. Science, 1998, 281(5375):363, 365.
- [17] 马永平, 易发平, 宋方洲, 等. 焦磷酸测序技术及其在分子生物学领域的应用[J]. 国外医学(分子生物学分册), 2003, 25(2):115-118.
- Ma YP, Yi FP, Song FZ, et al. Pyrosequencing and its application in molecular biology[J]. Foreign Medical Science(Molecular Biology Section), 2003, 25(2):115-118.
- [18] Schnitzler P, Schulz K, Lampson C, et al. Molecular analysis of linezolid resistance in clinical *Enterococcus faecium* isolates by polymerase chain reaction and pyrosequencing[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(1):121-125.
- [19] Frye JG, Lindsey RL, Rondeau G, et al. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database[J]. Microb Drug Resist, 2010, 16(1):9-19.
- [20] Cassone M, del Grosso M, Pantosti A, et al. Detection of genetic elements carrying glycopeptide resistance clusters in *Enterococcus* by DNA microarrays[J]. Mol Cell Probes, 2008, 22(3):162-167.

收稿日期:2014-07-10

修回日期:2014-11-08

(上接3页)

- Ge QW. The significance of retinol binding protein and prealbumin in the neonatal nutritional evaluation[J]. Lab Med, 2007, 22(2):198-199.
- [18] 郑雪莲, 李玉珍, 朱刚, 等. 血清前白蛋白、转铁蛋白及视黄醇结合蛋白在危重病人应用肠外营养支持中的意义[J]. 海南医学, 2009, 20(5):278-279.
- Zheng XL, Li YZ, Zhu G, et al. Significance of serum prealbumin, transferrin, and retinol binding protein in the critical patients with parenteral nutrition support[J]. Hainan Medical Journal, 2009, 20(5):278-279.
- [19] Rhie YJ, Choi BM, Eun SH, et al. Association of serum retinol binding protein 4 with adiposity and pubertal development in Korean children and adolescents[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(6):797-802.
- [20] Park CS, Ihm SH, Park HJ, et al. Relationship between plasma adiponectin, retinol-binding protein 4 and uric acid in hypertensive patients with metabolic syndrome[J]. Korean Circ J, 2011, 41(4):198-202.
- [21] 蔡晔芬, 黄清松. 免疫透射比浊法测定视黄醇结合蛋白的技术性能评价[J]. 宜春学院学报, 2011, 33(4):74-75.
- Cai YF, Huang QS. Performance evaluation of immune transmission turbidity for retinol binding protein[J]. Journal of Yichun College, 2011, 33(4):74-75.

收稿日期:2014-02-28

修回日期:2015-01-01